

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก หลายชนิดในเวลาเดียวกัน (ปรอท แคดเมียม สารหนู และตะกั่ว) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำมากในใบกระท่อม

Method validation for simultaneous determination of heavy metals (Hg, Cd,
As and Pb) at trace concentration levels in kratom leaves

ธาริณี ศรีดารา¹, สายจิต ดาวสุโข¹, สุนงกช ททรัพย์แดง¹, วีระ สวนไธสง¹

Tharinee Sridara¹, Saijit Daosukho¹, Subongkoch Subtaeng¹, Weera Suanthaisong¹

รับบทความ 12 มกราคม 2567 แก้ไขบทความ 23 กุมภาพันธ์ 2567 ยอมรับตีพิมพ์ 4 มีนาคม 2567

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักหลายชนิดในเวลาเดียวกัน ประกอบด้วย ปรอท แคดเมียม สารหนู และตะกั่ว ในใบกระท่อมที่ระดับความเข้มข้นต่ำมาก (หนึ่งส่วนต่อพันล้าน, ppb) ด้วยเทคนิค อินดักทีฟพลาสมา-ออปติคอลลูมิเนสเซนส์เพกโทรสโกปี (ICP-OES) และกระบวนการย่อยและการเตรียมสารละลาย ตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ได้ตัดแปรวิธีของ AOAC (999.10) โดยใช้ผงใบกระท่อมแห้งผสมกับกรดไนตริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการย่อยด้วยวิธีไมโครเวฟ ผลการศึกษาพบว่าช่วงการใช้งานของวิธีทดสอบปรอท แคดเมียม สารหนู และตะกั่วเท่ากับ 0.25 - 1.25, 0.05 - 1.25, 0.50 - 12.50 และ 0.50 - 12.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่าขีดจำกัด การตรวจหาของวิธี (LOD) เท่ากับ 0.050 (ปรอท), 0.010 (แคดเมียม), 0.15 (สารหนู) และ 0.15 (ตะกั่ว) มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดการวัดปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.25 (ปรอท), 0.050 (แคดเมียม), 0.50 (สารหนู) และ 0.50 (ตะกั่ว) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การศึกษาความโอนเอียงมีช่วงร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) เท่ากับ 67 - 74% (ปรอท), 80 - 82% (แคดเมียม), 83 - 91% (สารหนู) และ 80 - 82% (ตะกั่ว) การศึกษาความเที่ยงมีช่วงร้อยละส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของแคดเมียม สารหนู และตะกั่วอยู่ในช่วง 0.6 - 7.3% และปรอทอยู่ในช่วง 8.2 - 11.7% อีกทั้งค่าความไม่แน่นอนขยายของแคดเมียม สารหนู และตะกั่ว มีค่าน้อยกว่า $\pm 25\%$ และปรอทน้อยกว่า $\pm 38\%$ ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ เชิงปริมาณโลหะหนักในใบกระท่อม

คำสำคัญ: ปรอท แคดเมียม สารหนู ตะกั่ว กระท่อม ICP-OES

¹กองเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Abstract

This manuscript reports the validation of an analytical method for simultaneous determination of heavy metals (Hg, Cd, As and Pb) in Kratom at low concentrations (part per billion, ppb) using an inductive coupled plasma-optical emission spectrophotometer (ICP-OES). Sample preparation followed AOAC (999.10) guideline, involving the microwave digestion of dried Kratom leaves powder with nitric acid and hydrogen peroxide. The linear concentration ranges for Hg, Cd, As and Pb were found to be 0.25 - 1.25, 0.05 - 1.25, 0.50 - 12.50 and 0.50 - 12.50 mg/kg, respectively. Limits of detection (LOD) were determined as 0.050 (Hg), 0.010 (Cd), 0.15 (As) and 0.15 (Pb) mg/kg, with corresponding limits of quantitation (LOQ) at 0.25 (Hg), 0.050 (Cd), 0.50 (As) and 0.50 (Pb) mg/kg. The recovery bias showed percentages ranging from 67 - 74% (Hg), 80 - 82% (Cd), 83 - 91% (As) and 80 - 82 (As). Precision, represented by the percentage of relative standard deviations (%RSD), was within the range of 0.6 - 7.3% for Cd, As and Pb, and 8.2 - 11.7% for Hg. Additionally, expanded uncertainties for Cd, As and Pb were below $\pm 25\%$, and for Hg, it was below $\pm 38\%$, at a confidence level of 95%. These results affirm the reliability and suitability of the proposed method for the quantitative analysis of heavy metals in Kratom leaves.

Keywords: Mercury, Cadmium, Arsenic, Lead, Kratom, ICP-OES

¹Division of Community Technology, Department of Science Service

^{*}Corresponding author e-mail address: tharinee@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

กระพ้อม (Kratom; *Mitragyna speciosa*) เป็นพืชในเขตเมืองร้อน พบมากในประเทศแถบเอเชีย โดยเฉพาะทางตอนใต้ของประเทศไทย ในอดีตมักบริโภคด้วยการเคี้ยวใบสดหรือนำใบไปต้มน้ำสำหรับดื่ม เพื่อช่วยกระตุ้นให้เกิดความตื่นตัวและกระปรี้กระเปร่า อีกทั้งใช้เป็นยารักษาอาการปวดเมื่อยและลดอาการเจ็บปวด [1-2] สืบเนื่องจากกฎหมายของประเทศไทยได้ประกาศปลดพืชกระพ้อมออกจากรายการยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ภายใต้พระราชบัญญัติสารเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2564) [3] ส่งผลให้การใช้พืชกระพ้อมและผลิตภัณฑ์จากพืชกระพ้อมขยายตัวมากขึ้น อย่างไรก็ตามบริเวณพื้นที่เพาะปลูกพืชกระพ้อมอาจได้รับการปนเปื้อนจากสารเคมีอันตรายกลุ่มโลหะหนัก ที่อาจจะมาจากสภาวะแวดล้อมในพื้นที่เพาะปลูก เช่น ดิน น้ำ อากาศ รวมทั้งการใช้สารเคมีในการเพาะปลูก และสารปนเปื้อนในพืชกระพ้อมที่เกิดขึ้น อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค [4] ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในใบกระพ้อมจึงมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ทั้งนี้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องเกณฑ์มาตรฐาน ค่าความบริสุทธิ์ หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพ พ.ศ. 2564 ได้กำหนดปริมาณสูงสุดของโลหะปนเปื้อน 4 ชนิด ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร ดังนี้ปรอท (Hg), แคดเมียม (Cd), สารหนู (As), และตะกั่ว (Pb) ต้องไม่เกิน 0.5, 0.3, 5 และ 10 ส่วนในล้านส่วน (ppm) [5]

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักมีหลายเทคนิค ซึ่งแต่ละเทคนิคนั้นมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันไป เช่น (1) เทคนิค Atomic absorption spectrometry (AAS) ที่มีสภาพไว (Sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง แต่วิเคราะห์โลหะได้ทีละธาตุ อีกทั้งยังต้องใช้สารเคมีเพื่อช่วยให้เกิดปฏิกิริยา เช่น การใช้ Potassium iodide (KI) และ sodium tetrahydroborate (NaBH_4) ในการเกิด Hydride atomization เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารหนู หรือการใช้ Stannous chloride (SnCl_2) ในการเกิด Cold-vapour atomization เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ปรอท [4, 6-7] (2) เทคนิค Anodic stripping voltammetry (ASV) ที่มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์ได้หลายธาตุในเวลาเดียวกัน แต่มีความซับซ้อนในการเตรียมตัวอย่าง จากการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ดังนั้น ถ้าสารละลายตัวอย่างมีตัวรบกวนที่ไปบดบังการนำไฟฟ้าจะส่งผลโดยตรงต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ [4, 8] และ (3) เทคนิค Inductive coupled plasma (ICP) spectrometry ที่มีข้อดีคือมีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง วิเคราะห์ได้หลายธาตุในเวลาเดียวกัน แต่ก็มีข้อจำกัดในการวัดโลหะบางชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ [4, 9]

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์โลหะหนักหลายชนิดที่มีปริมาณน้อยมากได้พร้อมกัน ที่สามารถนำไปใช้ประเมินคุณภาพใบกระพ้อม โดยตรวจสอบคุณลักษณะด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับปริมาณโลหะหนัก ตามวิธีของ AOAC 2023 (999.10) [10] ที่มีการเปลี่ยนแปลงเครื่องมือตรวจวัด โดยการพัฒนาวิธีทดสอบครั้งนี้ได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโลหะปรอท, แคดเมียม, สารหนูและตะกั่ว ด้วยเทคนิค ICP-OES ที่สามารถนำไปทดสอบหาปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในใบกระพ้อมได้พร้อมกันอย่างรวดเร็ว โดยได้ศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธี ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity), ขีดจำกัดการตรวจหา (Limits of detection, LOD), ขีดจำกัดการวัดปริมาณ (Limits of quantitation, LOQ), ความเอนเอียง (Bias), ความเที่ยง (Precision) เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และสามารถตัดสินใจเกณฑ์ข้อกำหนดได้ รวมถึงการนำผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์ด้านการควบคุมคุณภาพใบกระพ้อมให้มีความปลอดภัยและการเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์อีกด้วย

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างใบกระพ้อม (จากจังหวัดชุมพร) เตรียมโดยนำใบกระพ้อมสดมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งสนิท แล้วนำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดรูพรุน 250 ไมครอน ผงใบกระพ้อมมีลักษณะเป็นผงแห้งและเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในตู้ดูดความชื้นสำหรับการทดลองต่อไป

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Inductive coupled plasma-optical emission spectrophotometer; ICP-OES ยี่ห้อ Thermo Fisher Scientific รุ่น iCAP PRO ผลิตจากประเทศเยอรมัน, เครื่องย่อยระบบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น TOPwave ผลิตจาก

ประเทศอังกฤษ, เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Quintix224-1S ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา, ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask, class A) และปิเปต (Volumetric pipette, class A) ขนาดต่าง ๆ

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารละลายมาตรฐานอ้างอิง (Reference standard solution) ยี่ห้อ Perkin Elmer, ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา ความเข้มข้น 1000 ± 5 mg/L สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน ได้แก่ สารละลายมาตรฐานปรอท (Lot No. 26-174HGY1), แคดเมียม (Lot No. 26-76CDY1), สารหนู (Lot No. 27-24ASAY1) และตะกั่ว (Lot No. 27-05PBY1)

2.3.2 สารละลายมาตรฐานอ้างอิง (Reference standard solution) ยี่ห้อ AccuStandard, ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา ความเข้มข้น 1000 ± 2.4 mg/L สำหรับการหาค่าขีดจำกัดการวัดปริมาณ ความไวและความเที่ยง ได้แก่ สารละลายมาตรฐานปรอท (Lot No. 223035027), แคดเมียม (Lot No. 222095085), สารหนู (Lot No. 222065166) และ ตะกั่ว (Lot No. 222065210)

2.3.3 กรดไนตริก (Nitric acid; HNO₃) ความเข้มข้นร้อยละ 65 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v), AR grade, ยี่ห้อ Merck, เยอรมัน

2.3.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H₂O₂) ความเข้มข้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก (%w/w), AR grade, ยี่ห้อ Merck, เยอรมัน

2.4 วิธีดำเนินงาน

2.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (Preparation of standard solution for calibration curve)

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution, ข้อ 2.3.1) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100.00 mL เจือจางและปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร (%v/v) เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานผสม (Mixed standard solution, MSTD) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมของโลหะหนักสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลาย	ความเข้มข้น (µg/L)			
	ปรอท	แคดเมียม	สารหนู	ตะกั่ว
Calibration blank	0.00	0.00	0.00	0.00
MSTD 1	1.00	1.00	10.00	10.00
MSTD 2	5.00	5.00	50.00	50.00
MSTD 3	10.00	10.00	100.00	100.00
MSTD 4	15.00	15.00	150.00	150.00
MSTD 5	20.00	20.00	200.00	200.00
MSTD 6	25.00	25.00	250.00	250.00

2.4.2 การย่อยและการเตรียมสารละลายตัวอย่าง (Digestion and preparation of sample solution)

ชั่งตัวอย่างผงใบกระท่อม 1.00 g แล้วถ่ายตัวอย่างไปยังหลอดย่อย (Digestion vessel) จากนั้นเติม กรดไนตริกเข้มข้น 8 mL และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 2 mL ตามลำดับ ปิดฝาหลอดย่อยให้อยู่ในระบบปิด แล้วนำไปย่อยด้วยเครื่องไมโครเวฟ ย่อยจนสารละลายใสไม่มีตะกอน โดยใช้เวลาย่อยทั้งหมด 75 นาที (พารามิเตอร์ที่ใช้ในการย่อยแสดงดังตารางที่ 2) จากนั้นยกออกจากเครื่องและปล่อยให้เย็นจนกระทั่งถึงอุณหภูมิห้อง เทสารละลายตัวอย่าง ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองสารละลายผ่าน Nylon syringe filter ขนาดรูพรุน 0.45 µm เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES (ภาวะการทำงานเครื่อง ICP-OES แสดงดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการย่อยด้วยเครื่องไมโครเวฟ

ขั้นที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พลังงาน (วัตต์)	เวลา (นาที)
1	170	90	15
2	200	90	30
3	50	0	10
4	50	0	10
5	50	0	1

ตารางที่ 3 ภาวะการทำงานของเครื่อง ICP-OES

Analysis mode	Axial view, iFR mode
Rf power	1150 W
Gas flow rate	Plasma (argon) 12.5 L/min Auxiliary gas 0.50 L/min Nebulizer 0.35 L/min
Pump speed	45 rpm
Wavelength	Hg 184.950 nm As 189.042 nm Pb 220.353 nm Cd 226.502 nm

2.4.3 การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาความเอนเอียงและความเที่ยง (Preparation of solution for bias and precision study)

การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาในขั้นตอนนี้ ทำวิธีเดียวกับข้อ 2.4.2 แต่มีการเติมสารละลายมาตรฐานโลหะหนักชนิดต่าง ๆ (เตรียมจาก Stock solution, ข้อ 2.3.2) ที่สามระดับความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 4 ปริมาณอย่างละ 1.00 mL ในแต่ละตัวอย่างก่อนปิดหลอดย่อย

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมที่สามระดับความเข้มข้น

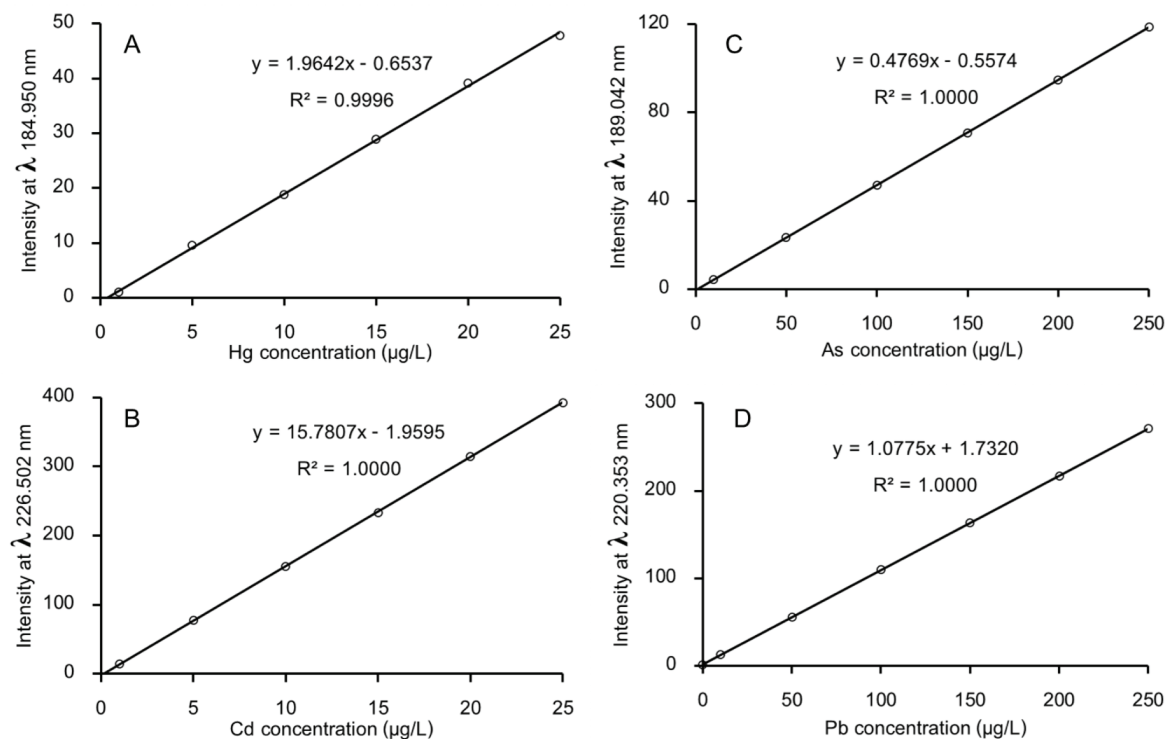
สารละลาย	ความเข้มข้น (µg/L)			
	ปรอท	แคดเมียม	สารหนู	ตะกั่ว
ระดับต่ำ	5.00	1.00	10.00	10.00
ระดับกลาง	15.00	15.00	150.00	150.00
ระดับสูง	25.00	25.00	250.00	250.00

3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 ช่วงการใช้งานของเครื่องมือ (Instrument working range)

การใช้เครื่องมือ ICP-OES ในการทดสอบปริมาณโลหะหนักมีข้อดีคือสามารถวิเคราะห์โลหะได้รวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้หลายธาตุในเวลาเดียวกัน และเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการทดสอบในสารละลายที่มีระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ เนื่องจากมีสภาพไว (Sensitivity) ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ในการวิเคราะห์สูง จากการหาปริมาณโลหะในสารละลายผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยอาศัยความยาวคลื่นแสงที่จำเพาะกับโลหะนั้น ๆ พบว่าสัญญาณความเข้มแสง (Intensity) ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับความเข้มข้น (Concentration, µg/L)

ของโลหะหนักที่เพิ่มขึ้น เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโลหะกับความเข้มแสง ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($y = mx + c$) ของโลหะทั้งสี่ธาตุ มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) เข้าใกล้ 1 แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นของสารละลายที่คำนวณจากสมการเส้นตรงดังกล่าวมีความถูกต้องสูง



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (Concentration, $\mu\text{g/L}$) ของโลหะที่สนใจวิเคราะห์กับความเข้มแสง (Intensity) ที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะกับโลหะนั้น ๆ ได้แก่ปรอท; 184.950 nm (A), แคดเมียม; 226.502 nm (B), สารหนู; 189.042 nm (C) และตะกั่ว; 220.353 nm (D)

จากการศึกษาขีดจำกัดของเครื่องมือวัด (Instrumental detection limit, IDL) ตามวิธี U.S. EPA. Method 6010D, 2014 [11] โดยทำการทดสอบในสารละลาย Calibration blank จำนวน 10 ซ้ำ พบว่ามีค่า IDL เท่ากับ 0.50, 0.10, 2.5 และ 1.8 $\mu\text{g/L}$ สำหรับปรอท แคดเมียม สารหนูและตะกั่ว ตามลำดับ และได้ศึกษาความถูกต้องของเครื่องมือ มีร้อยละความถูกต้อง (%Accuracy) อยู่ในช่วง 80 - 105% ดังตารางที่ 5 จึงยืนยันได้ว่าเครื่องมือสามารถวัดปริมาณธาตุทั้งสี่ได้ถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด จึงนำเครื่องมือนี้ไปใช้ตรวจสอบหาปริมาณ LOD, LOQ, ความเอนเอียง และความเที่ยงของวิธี

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละความถูกต้อง (%Accuracy) และร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการทดสอบในสารละลาย calibration blank สำหรับยืนยันความสามารถของเครื่องมือ

ธาตุ	ความเข้มข้นที่ตรวจยืนยัน ($\mu\text{g/L}$)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้เฉลี่ย ($\mu\text{g/L}$) \pm SD (n = 10)	%Accuracy	%RSD
ปรอท	5.00	4.00 \pm 0.14	80	2.3
แคดเมียม	1.00	1.05 \pm 0.05	105	4.9
สารหนู	10.00	8.70 \pm 0.63	89	7.2
ตะกั่ว	10.00	8.45 \pm 0.46	85	5.5

3.2 ขีดจำกัดการตรวจหาของวิธี (Limits of detection, LOD) และขีดจำกัดการวัดปริมาณของวิธี (Limits of quantitation, LOQ)

ผลการศึกษา LOD และการประมาณค่า LOQ ของวิธี โดยทำการทดสอบ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ (repeatability, n=10) แล้วนำมาคำนวณตามสมการที่ (1) (2) และ (3) ตามลำดับ [12] พบว่าได้ค่า LOD และค่าประมาณ LOQ แสดงดังตารางที่ 6

$$\text{LOD} = 3(S'_0) \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10(S'_0) \quad (2)$$

$$S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} \quad (3)$$

เมื่อ S_0 คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณจากผลการทดสอบใน Sample blank (repeatability, n=10)

n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการใช้สำหรับรายงานผลการทดสอบ (n=2)

n_b คือ จำนวนซ้ำของ Blank ที่ใช้ในการทดสอบ (n=1)

ตารางที่ 6 แสดงขีดจำกัดของวิธี (LOD) และค่าประมาณขีดจำกัดการวัดปริมาณของวิธี (LOQ)

ธาตุ	LOD		ค่าประมาณ LOQ	
	(µg/L)	(mg/kg)	(µg/L)	(mg/kg)
ปรอท	1.0	0.050	3.0	0.15
แคดเมียม	0.20	0.010	1.0	0.050
สารหนู	3.0	0.15	10.0	0.50
ตะกั่ว	3.0	0.15	10.0	0.50

เมื่อได้ค่าประมาณ LOQ แล้ว ทำการตรวจยืนยัน LOQ ของวิธี โดยทำการเตรียมสารละลาย Sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของโลหะทั้ง 4 ธาตุ ที่ความเข้มข้น 5, 1, 10 และ 10 µg/L สำหรับปรอท แคดเมียม สารหนู และปรอท ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เลือกพิสูจน์ความแม่นยำและความเที่ยง จำนวนความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณร้อยละการคืนกลับและร้อยละค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ตามสมการที่ (4) และ (5) พบว่า %Recovery และ %RSD สำหรับปรอท แคดเมียม สารหนู และตะกั่ว ดังแสดงในตารางที่ 7 ในส่วนของความเข้มข้นที่ระดับต่ำสุดของแต่ละธาตุอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ยกเว้นปรอทที่มี %Recovery น้อยกว่าเกณฑ์กำหนด เนื่องจากปรอทเป็นโลหะประเภทระเหยง่าย (Volatile) และการศึกษาปริมาณปรอทครั้งนี้อยู่ในระดับความเข้มข้นน้อยมาก (ระดับส่วนในพันล้านส่วน, ppb) จึงเกิดการสูญเสียได้ง่ายในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แม้ว่าขั้นตอนการเตรียมจะได้ดำเนินการในระบบปิดแล้วก็ตาม

3.3 ความเอนเอียง (Bias)

การศึกษาความเอนเอียงสำหรับช่วงการใช้งานของวิธี โดยทำการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของโลหะทั้ง 4 ธาตุ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ต่ำ กลาง และสูง) ภายใต้การวิเคราะห์ 8 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณ %Recovery ตามสมการที่ (4) พบว่าโลหะที่สนใจวิเคราะห์ทุกระดับความเข้มข้นมีค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์กำหนด แสดงในตารางที่ 7 ยกเว้นปรอทที่มี %recovery น้อยกว่าเกณฑ์กำหนด

$$\% \text{Recovery} = \frac{C_{\text{obs}} - C_{\text{native}}}{C_{\text{spike}}} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ C_{obs} คือ ความเข้มข้นที่วัดได้

C_{native} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐาน

C_{spike} คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล

\bar{X} คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูล

ตารางที่ 7 ค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของโลหะทั้ง 4 ธาตุ ในสารละลายตัวอย่างไปกระท่อมที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง

ธาตุ	ความเข้มข้นที่เติม (µg/L)	ค่าอ้างอิง (mg/kg)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้โดยเฉลี่ย (mg/kg) ± SD (n=8)	%recovery*	%RSD**
ปรอท	5.0	0.25	0.17 ± 0.01	67	8.1
	15.0	0.75	0.53 ± 0.02	71	2.9
	25.0	1.25	0.93 ± 0.01	74	0.9
แคดเมียม	1.0	0.050	0.062 ± 0.001	80	2.0
	15.0	0.75	0.64 ± 0.01	82	1.6
	25.0	1.25	1.05 ± 0.01	82	0.7
สารหนู	10.0	0.50	0.46 ± 0.03	83	6.3
	150.0	7.50	6.52 ± 0.06	86	0.8
	250.0	12.5	11.4 ± 0.1	91	0.7
ตะกั่ว	10.0	0.50	0.66 ± 0.02	80	3.0
	150.0	7.50	6.40 ± 0.17	82	2.6
	250.0	12.5	10.6 ± 0.1	82	0.6

หมายเหตุ

*เกณฑ์ยอมรับได้ %Recovery; 60 - 115% ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg และ 80 - 110% ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 - 10 mg/kg [13]

**เกณฑ์ยอมรับได้ %RSD; 21% ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg, 15% ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg, 11% ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/kg และ 7.3% ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/kg [13]

3.4 ความเที่ยง (Precision)

การศึกษาความเที่ยงโดยทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานผสมของโลหะทั้ง 4 ธาตุ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ต่ำ กลาง และสูง) ภายใต้การวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้งในวันที่แตกต่างกัน (Intermediate precision) แล้วประเมินค่าความเที่ยงจาก %RSD ตามสมการที่ (5) พบว่าโลหะที่สนใจวิเคราะห์ทุกระดับความเข้มข้น มี %RSD อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 8 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 8 ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของโลหะทั้ง 4 ธาตุ ในสารละลายตัวอย่างใบกระท่อมที่เดิมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง

ธาตุ	ความเข้มข้นที่เดิม (µg/L)	ค่าอ้างอิง (mg/kg)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้โดยเฉลี่ย (mg/kg) ± SD (n=6)	%RSD*
ปรอท	5.0	0.25	0.18 ± 0.02	11.7
	15.0	0.75	0.61 ± 0.06	9.2
	25.0	1.25	0.96 ± 0.08	8.2
แคดเมียม	1.0	0.050	0.065 ± 0.002	2.7
	15.0	0.75	0.63 ± 0.01	1.0
	25.0	1.25	1.03 ± 0.01	0.7
สารหนู	10.0	0.50	0.52 ± 0.04	7.3
	150.0	7.50	6.84 ± 0.09	1.3
	250.0	12.5	11.3 ± 0.1	0.9
ตะกั่ว	10.00	0.50	0.65 ± 0.03	4.4
	150.0	7.50	6.18 ± 0.10	1.5
	250.0	12.5	10.2 ± 0.1	0.6

หมายเหตุ *เกณฑ์ยอมรับได้ %RSD; 21% ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg, 15% ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg, 11% ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/kg และ 7.3% ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/kg [13]

3.5 การประมาณค่าความไม่แน่นอน (Measurement uncertainty)

จากการศึกษาข้างต้นสามารถนำข้อมูลที่ได้มาประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด โดยคำนวณตามสมการที่ (6) [14] และได้พิจารณาที่ความเข้มข้นระดับกลางของช่วงการวิเคราะห์ของโลหะทั้ง 4 ธาตุ

$$u_c = C \sqrt{u(R)^2 + \left(\frac{u(P)}{P}\right)^2} \quad (6)$$

เมื่อ u_c คือ ค่าความไม่แน่นอนรวม

C คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

$u(R)$ คือ ความไม่แน่นอนจากการทดสอบความโอนเอียง

$u(P)/P$ คือ ความไม่แน่นอนจากการทดสอบความเที่ยง

ซึ่งค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบความโอนเอียง, $u(R)$ ในการศึกษา (ข้อ 3.3) เป็นการศึกษาแบบ Spiking individual portions of a "blank matrix" จึงคำนวณค่า $u(R)$ ตามสมการที่ (7) และ (8) ตามลำดับ และค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบความเที่ยง, $u(P)/P$ ได้มาจากการศึกษาความเที่ยง (ข้อ 3.4) โดยพิจารณาจาก RSD ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง หรือสูง แล้วเลือกค่าที่การกระจายกว้างที่สุดมาแทนค่าเป็น $u(P)/P$ [14]

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \sqrt{\left(\frac{s^2 m_{obs}}{n \times m_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(m_{spike})}{m_{spike}}\right)^2} \quad (7)$$

$$u(R) = \sqrt{u(\bar{R}_m)^2 + u(R_s)^2} \quad (8)$$

เมื่อ $u(\bar{R}_m)$	คือ ค่าความไม่แน่นอนขยายของค่าคืนกลับ
\bar{R}_m	คือ ค่าคืนกลับ
$S_{m\text{ obs}}$	คือ RSD ของค่าคืนกลับ
n	คือ จำนวนการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability, $n = 8$)
\bar{m}_{obs}	คือ ความเข้มข้นเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้
$u(m_{\text{spike}})$	คือ ค่าความไม่แน่นอนของ CRM
m_{spike}	คือ ความเข้มข้นของ CRM ที่เติม

ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของธาตุแคดเมียม สารหนู และตะกั่ว พบว่ามีค่าน้อยกว่า $\pm 25\%$ สรุปดังตารางที่ 9 ยกเว้นปรอทมีค่าความไม่แน่นอนขยายเท่ากับ $\pm 38\%$ ซึ่งมีค่าความไม่แน่นอนในการวิเคราะห์กว้างกว่าโลหะหนักอื่น ๆ เนื่องจากการวิเคราะห์ปรอทด้วยเทคนิค ICP-OES มีค่าความผิดพลาดเชิงระบบสูงกว่าดังเหตุผลที่กล่าวในข้อ 3.2 หากต้องการวิเคราะห์ปริมาณปรอทที่มีค่าความไม่แน่นอนลดลง จำเป็นต้องใช้เครื่องมืออื่นที่มีความจำเพาะเจาะจง ได้แก่ Mercury analyzer แต่อย่างไรก็ตามการศึกษครั้งนี้ไม่พบปริมาณปรอทในตัวอย่างไบกระท่อม รวมถึงปริมาณแคดเมียม, สารหนู และตะกั่วที่พบมีปริมาณน้อยกว่า LOQ เมื่อคำนวณความเข้มข้นในหน่วย mg/kg ตามสมการที่ (9) พิจารณาร่วมกับความไม่แน่นอนขยาย (U) จะเห็นว่าปริมาณโลหะที่วิเคราะห์ในตัวอย่างไบกระท่อมไม่เกินค่าตามมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุขกำหนด ทั้งนี้หากวิเคราะห์ในตัวอย่างไบกระท่อมจากแหล่งที่มาอื่น ๆ แล้วผลการทดสอบมีค่าน้อยกว่า LOQ ของวิธี แสดงว่าวิธีทดสอบนี้ยังคงสามารถใช้ตัดสินได้ว่าเป็นไปตามกฎหมายกำหนดหรือไม่ จึงสรุปได้ว่าวิธีทดสอบปริมาณโลหะปรอท แคดเมียม สารหนู และตะกั่วที่ศึกษานี้สามารถใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างไบกระท่อมได้

$$\text{ความเข้มข้น (mg/kg)} = \frac{C \times D \times V}{wt \times 1000} \quad (9)$$

- เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่หักลบค่าแบลนด์ (μg/L)
D คือ แฟกเตอร์สำหรับการเจือจาง
V คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (mL)
wt คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ตารางที่ 9 สรุปค่าความไม่แน่นอนของวิธีทดสอบ

ความเข้มข้นที่เติม (μg/L)	ปรอท	แคดเมียม	สารหนู	ตะกั่ว
ค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบความโอนเอียง, $u(R)$	0.149	0.090	0.080	0.091
ค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบความเที่ยง, $u(P)/P$	0.117	0.027	0.073	0.044
ความเข้มข้น, C (mg/kg)	0.75	0.75	7.5	7.5
ค่าความไม่แน่นอนรวม, u_c (mg/kg)	0.142	0.070	0.813	0.757
ค่าความไม่แน่นอนขยาย, U (mg/kg) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k=2$)	0.28	0.14	1.63	1.51
ค่าความไม่แน่นอนขยาย, U (%)	37.9	18.8	21.7	20.2
LOQ $\pm U$ (mg/kg)	0.25 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.50 ± 0.11	0.50 ± 0.10
เกณฑ์กำหนดปริมาณตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (mg/kg)	ไม่เกิน 0.5	ไม่เกิน 0.3	ไม่เกิน 5	ไม่เกิน 10

4. สรุป (Conclusion)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ทดสอบโลหะปรอท แคดเมียม สารหนู และตะกั่ว ในตัวอย่างใบกระท่อม โดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างด้วยกรดเข้มข้นร่วมกับการย่อยด้วยไมโครเวฟที่ดัดแปลงมาจากวิธี AOAC แล้วตรวจวัดเชิงปริมาณด้วยเทคนิค ICP-OES เมื่อทำการศึกษาคู่คุณลักษณะเฉพาะต่าง ๆ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงในการวิเคราะห์ ซีดจำกัดการตรวจหา ซีดจำกัดการวัดปริมาณ ความไว และความเที่ยง พบว่าผลที่วิเคราะห์ได้เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ รวมถึงค่าความไม่แน่นอนในการวัดน้อยกว่าเป้าหมายที่ตั้งไว้ (น้อยกว่า $\pm 25\%$) ยกเว้นปรอทซึ่งมีความไวและความไม่แน่นอนของการวัดที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด หากนำวิธีนี้ไปใช้ทดสอบหาปริมาณปรอทร่วมกับธาตุอื่น จำเป็นจะต้องพิจารณาเกณฑ์กำหนดปริมาณต่ำสุดตามที่กฎหมายกำหนดร่วมด้วย ดังนั้นการศึกษานี้สามารถนำไปวิเคราะห์ทดสอบและตัดสินปริมาณสารตกค้างในใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ ได้ตามวัตถุประสงค์

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มวิจัยและพัฒนาเซรามิกและแก้ว กลุ่มวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กองเทคโนโลยีชุมชน และกลุ่มผลิตภัณฑ์โลหะ กองเคมีภัณฑ์และผลิตภัณฑ์อุปโภค ที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือจนการศึกษานี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ ขอขอบคุณผู้บังคับบัญชาและบุคลากรกรมวิทยาศาสตร์บริการทุกท่านที่ทำให้การดำเนินงานลุล่วงไปได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] วุฒิชัย รุ่งเรือง. พิษวิทยาของพืชกระท่อม. วารสารเภสัชกรรมโรงพยาบาล. 2563 พฤษภาคม - สิงหาคม;30(2):118 - 124.
- [2] Subtaeng S, Kruatian T, Jitpreeda P, Wanitsuwan W. Method validation for determination of mitragynine in Kratom leaf extract by high performance liquid chromatography. Bull Appl Sci. 2023 July - December;12(2):10 - 22. doi:10.60136/bas.v12.2023.621.
- [3] พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2564). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 138 ตอนที่ 35 ก.
- [4] Guo C, Lv L, Liu Y, Ji M, Zang E, Liu Q, Zhang M, Li M. Applied analytical methods for detecting heavy metals in medicinal plants. Crit Rev Anal Chem. 2023;53(2):339 - 359. doi:10.1080/10408347.2021.1953371.
- [5] ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์มาตรฐาน ค่าความบริสุทธิ์ หรือคุณลักษณะอื่นอันมีความสำคัญต่อคุณภาพ สำหรับตำรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขึ้นทะเบียน แจ้งรายละเอียด หรือจดแจ้ง (พ.ศ. 2564). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 138 ตอนพิเศษ 294 ง. หน้า 6.
- [6] Ministry of Public Health, Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2021. Bangkok: Keawjawjom Printing & Publishing Suan Sunandha Rajabhat University; 2021.
- [7] Rashid M, Fardous Z, Chowdhury M, Alam M, Bari M, Moniruzzaman M, Gan SH. Determination of heavy metals in the soils of tea plantations and in fresh and processed tea leaves: an evaluation of six digestion methods. Chem Cent J. 2016;10(1):1-13. doi:10.1186/s13065-016-0154-3.
- [8] Mamani MCV, Aleixo LM, Abreu MF, Rath S. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. J Pharm Biomed Anal. 2005;37(4):709-713. doi:10.1016/j.jpba.2004.11.049.
- [9] Markandeya AG, Firke NP, Pingale SS, Salunke-Gawali S. Quantitative elemental analysis of Celocia

- argentea leaves by ICP-OES technique using various digestion methods. *Int J Chem Anal Sci.* 2013;4(4):175-181. doi:10.1016/j.ijcas.2013.08.003.
- [10] AOAC International. Lead cadmium zinc copper iron in foods. Atomic absorption spectrophotometry after microwave digestion. AOAC official methods of analysis 999.10. 21st ed. Rockville, Maryland: AOAC International; 2023.
- [11] U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Method 6010D (SW-846) revision 4: 2014. Washington, DC.: U.S. EPA; 2014.
- [12] Eurachem Method Validation Working group. Eurachem guide the fitness for purpose of analytical method-A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. Belgium: Eurachem Secretary; 2014.
- [13] AOAC International. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. AOAC official methods of analysis. Rockville, Maryland: AOAC International; 2016.
- [14] Barwick VJ, Ellison SLR. VAM Project 3.2.1. Development and harmonization of measurement uncertainty principles. part (d): protocol for uncertainty evaluation from validation data. Report no. LGC/VAM/1998/088. LGC (Teddington) Limited; 2000.

